

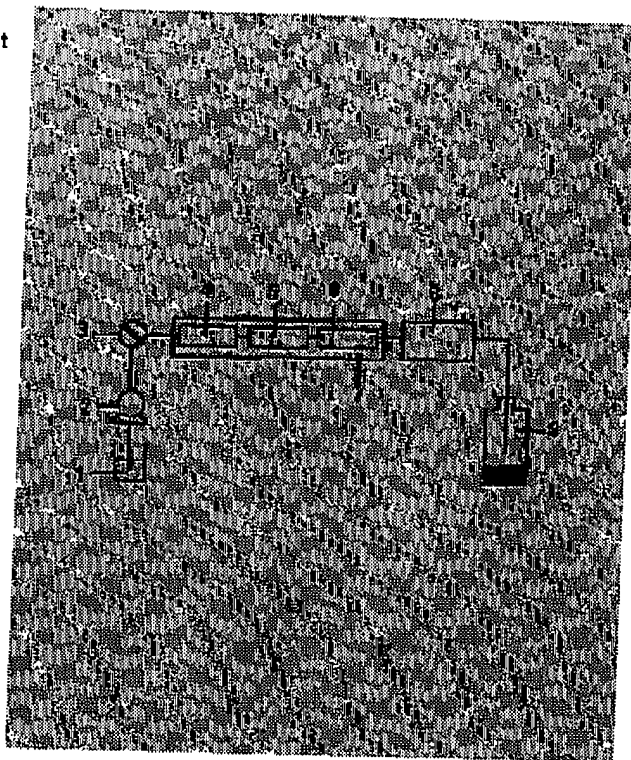
## DETERMINATION OF GLYCOSYLATED PROTEIN AND DETERMINATION APPARATUS

Patent number: JP11196897  
Publication date: 1999-07-27  
Inventor: YOSHIZU HIROSHI; OKAMURA AKIHIKO  
Applicant: KDK CORP  
Classification:  
- International: C12Q1/37; C12Q1/26  
- European:  
Application number: JP19980015064 19980109  
Priority number(s):

### Abstract of JP11196897

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To determine a glycosylated protein clinically useful as an important index for diagnosis of symptoms and control of symptom of diabetes mellitus in high accuracy by using a protease immobilized column in measuring glycosylated protein in a sample.

**SOLUTION:** A glycosylated protein which is clinically extremely useful as an important index of diagnosis of symptom for diabetes mellitus and control of symptom therefor is measured by using a protease immobilizing column 4 and a fructosylamino acid oxidase-immobilized column 5. A sample is passed from a solution vessel 1 through a transfer pipe and made to flow into a pump 2 and passed through an injection pulp 3 and fragmented by the protease-immobilized column 4 and the glycosylated protein is decomposed by the fructosylamino acid oxidase-immobilized column 5 and the generated hydrogen peroxide is decomposed by a peroxidase immobilized column 6 and a coloring agent is colored by the decomposed material and the coloring is measured by a detector 8 to determine glycosylated protein.



Data supplied from the esp@ceret database - Patent Abstracts of Japan

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-196897

(43) 公開日 平成11年(1999) 7月27日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	繰列記号	FI
C12Q 1/37		C12Q 1/37
1/26		1/26

審査請求 未請求 請求項の数9 FD (全7頁)

(21) 出願番号	特願平10-15064	(71) 出願人	000141897 株式会社京都第一科学 京都府京都市南区東九条西明田町57番地
(22) 出願日	平成10年(1998) 1月9日	(72) 発明者	古津 博 京都市南区東九条西明田町57 株式会社京都第一科学内
		(72) 発明者	岡村 明彦 京都市南区東九条西明田町57 株式会社京都第一科学内

(54) 【発明の名称】 糖化タンパク質の測定方法及び測定装置

(57) 【要約】

【課題】 試料中に存在するアマドリ化合物濃度を効率よく且つ精度の高い測定結果を得る。

【解決手段】 プロテアーゼ及びフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを固定化担体に固定化したカラムを用いてフローインジェクションによる測定装置で測定することにより、プロテアーゼの自己消化及びプロテアーゼによるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの分解を防ぐことができた。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中の糖化タンパク質を測定する場合に、プロテアーゼ固定化カラムを用いることを特徴とする糖化タンパク質の測定方法。

【請求項2】 試料中の糖化タンパク質を測定する場合に、プロテアーゼ固定化カラムとフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化カラムを用いることを特徴とする糖化タンパク質の測定方法。

【請求項3】 請求項1及び請求項2に記載する糖化タンパク質の測定に用いるプロテアーゼ固定化カラム。

【請求項4】 請求項3に記載する糖化タンパク質の測定に用いるプロテアーゼ固定化カラムに充填するプロテアーゼ固定化担体。

【請求項5】 請求項1及び請求項2に記載する糖化タンパク質の測定に用いるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化カラム。

【請求項6】 請求項5に記載する糖化タンパク質の測定に用いるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化カラムに充填するフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化担体。

【請求項7】 該プロテアーゼがプロテアーゼXIV、スミチンAMP、プロナーゼ、プロティナーゼK、ズブチリンの内少なくとも1つが選択されることを特徴とする請求項3又は請求項4に記載するカラム又は固定化担体。

【請求項8】 プロテアーゼ固定化カラムを用いて試料中の糖化タンパク質を測定する測定装置。

【請求項9】 試料中の糖化タンパク質を測定する場合に、少なくともプロテアーゼ固定化カラムとフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化カラムを用いることを特徴とする糖化タンパク質の測定装置。

## 【0001】

## 【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】 本発明は試料中に存在する糖化タンパク質の濃度を測定する場合において、酵素を用いる測定、具体的にはフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いて行う方法及び装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 糖化タンパク質は、タンパク質を構成するアミノ酸のアミノ基と、アルドース等の還元糖のアルデヒド基とが非酵素的に且つ非可逆的に結合して生成される物質であり、この非酵素的且つ非可逆的な結合をアマドリ転位と呼ぶことからアマドリ化合物とも言われている。糖化タンパク質の生成速度は、タンパク質と還元糖の濃度、接触時間、温度に依存しており、タンパク質と還元糖の量が多く、両者の接触時間が長い程、蛋白質の変性が起きない程度で温度が高い程、糖化蛋白質の生成速度は早くなり、生成量が多くなる。また生体中では、糖化される蛋白質の半減期によって糖化タンパク質の濃度が異なることから、糖化タンパク質の濃度を測定

(2)

特開平11-196897

2

することにより、様々な情報を得ることができる。例えば、血液中のヘモグロビンが糖化されたアマドリ化合物は糖化ヘモグロビン、アルブミンが糖化されたアマドリ化合物は糖化アルブミン、血液中の糖化物の還元能はフルクトサミンと呼ばれる。これらの血中濃度は、生体中における過去一定期間の平均血糖値をそれぞれ反映しており、それら測定値は、糖尿病の症状の診断及び症状の管理の重要な指標となり得るために、測定手段の確立は臨床に極めて有用である。

10 【0003】従来の糖化タンパク質の測定法としては、等電点分画電気泳動法、陽イオン交換クロマトグラフィー、分光測定法、比色定量法、HPLC法、ミニカラム法、アフィニティークロマトグラフィーなどが挙げられ（検査と技術、第14巻11号 第1155頁（1986）参照）、様々な糖化タンパク質量測定が臨床に用いられていた。

20 【0004】しかしこれらの方法は、検出感度や操作性や検体処理に長時間を有するなどの問題点が存在し、必ずしも満足する方法とは言いがたく、実用上解決されなければならない。理想的には検出感度が高く、多数の検体を短時間の内に簡便かつ高精度に測定できる方法および装置が要望される。

【0005】これらの問題点を解決する方法として、糖化タンパク質の糖化部位の一つであるグルシトールリジン残基に特異的な親和性を有する抗血清やモノクローナル抗体を取得し、放射性同位元素を標識した免疫測定法（RIA）による糖化タンパク質の測定が報告されている（J.Clin.Invest.,72,1427(1983)、臨床病理 第33巻補冊(1985) 第226頁、糖尿病 第29巻第581頁（1986）、Clínica.Chimica.Acta.,133,293(1986)、糖尿病 第28巻 第695頁（1985）参照）。

【0006】免疫学的測定法は、いずれも糖化タンパク質のアマドリ化合物に対する抗還元型糖化タンパク質抗体を使用しており、糖化タンパク質測定法としては優れた方法であるが、臨床的に意義の高いアルブミンやヘモグロビンに分離する必要があることやタンパク質の総量を別途行う必要があること、還元反応前に糖とタンパク質を分離する前処理が必要となるなど、特異性及び操作性の問題点が残る（糖尿病 第34巻補冊第96頁（1986年）参照）。

【0007】上述した問題点を解決した免疫学的測定方法として、特定タンパク質のみを認識する固定化抗体によって試料中の特定タンパク質のみを選択的に捕捉させてB/F分離を行い、標識化ポリマー酸誘導体を添加して糖化部位に結合させてB/F分離を行い、残存する標識物を測定することによって特定タンパク質の糖化割合を求める方法がある（特開5-87809号）が、B/F分離を2回も行わなければならないため非常に操作が煩雑であり、結果として測定に長時間が必要となるため多数検体処理が非常に困難となり、更に非特異的反応による影響

3

を受けるために精度の高い測定を行うことができない問題点を抱えている。

【0008】測定反応系におけるpHまたはイオン強度における変動の影響を受けにくいフェニルボロン酸のアフィニティークロマトグラフィーは、糖化タンパク質の分離法として優れた方法であり、アミコン・コーポレーションやピアス・ケミカル・カンパニーなどが、固定化したフェニルボロン酸を含む臨床使用のためのキットを開発している（英国特許出願公開第2,024,829号および米国特許第4,269,605号）。しかしながら、測定のための試料量が比較的多く必要であることや糖化タンパク質とフェニルボロン酸の結合が温度による影響を受けるため精度の高い測定ができない。

【0009】固相化したフェニルボロン酸により糖化タンパク質を分離し、特定タンパク質のみを認識する標識化抗体を用いる方法（特開62-100660号）が報告されているが、糖化割合を知るために特定タンパク質の総量を別途測定する必要があり、また糖化タンパク質とフェニルボロン酸の結合が温度による影響を受けるために精度の高い測定ができない問題が残されている。

【0010】蛍光標識化したボロン酸誘導体を糖化アルブミンの検出用試薬とし、蛍光波長の変化より糖化アルブミンを定量する方法（Clin.Chem.Acta,149,13(1985)）が報告されている。この方法は、原理的に検出試薬が不特定の糖化タンパク質と反応する点、特定タンパク質の総量を別途測定する必要があり、更に特定タンパク質に対する特異性が低い点で特定タンパク質の糖化割合を測定する方法としては適していない。

【0011】これらの問題を解決する方法として、特開64-16964号公報には、固相化した抗体により特定タンパク質を分離し、グリシトールリジン、グリシトールリン残基などの還元型の糖化部分を特異的に認識するモノクローナル抗体にて特定糖化タンパク質量、または特定タンパク質の糖化割合を測定する方法が報告されている。この方法は、特定タンパク質の総量を測定する必要がなく糖化割合が測定される点で優れた方法であるが、再現性や検量線直線性が乏しく、認識糖化部位が糖化部位の一部にすぎないこと、測定時間が5時間以上を要することなどの問題点を有している。

【0012】また、蛍光色素で標識化したボロン酸誘導体を試料中のヘモグロビンと反応させ、担体に固定化した抗体でヘモグロビンを捕捉し、ヘモグロビン全量を比色によって測定し、更に糖化ヘモグロビンを蛍光測定にて測定し、ヘモグロビンの糖化割合を測定する方法が報告されている（米国特許第4,861,728号）。しかし、担体に固定化された抗体量に対して大過剰に存在する試料中の糖化ヘモグロビン全量以上の蛍光色素で標識化されたボロン酸誘導体が必要な点が、経済的な測定法ではなく、糖化割合を測定するのに比色測定と蛍光測定の2つの測定を必要とする点で、操作性、簡便性、汎用性に問

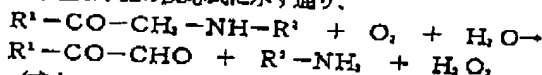
(3)

特開平11-196897

4

題がある。

【0013】上述した以外の方法に糖化タンパク質を測定する方法としては、酵素を用いる測定方法があり、測定原理は下記の反応式に示す通り、



（式中、 $R^1$ はアルドース残基、 $R^2$ はアミノ酸、タンパク質又はペプチド残基を表す）糖化タンパク質に酸化還元酵素を作用させ、酸素の消費量又は生成物（例、過酸化水素）の産生量を測定することにより糖化タンパク質濃度を求めることができる（特公平5-33997号公報、特公平6-65300号公報、特開平2-195900号公報、特開平3-155780号公報、特開平4-4874号公報、特開平5-192193号公報、特開平6-46846号公報、特開平7-289253号公報、特開平8-154672号公報、特開平8-336386号公報）。さらに、糖尿病の診断のための糖化タンパク質の測定法も知られている（特開平2-195899号公報、特開平2-195900号公報、特開平5-192193号公報（EP0 526 150 A）、特開平6-6846号公報（EP 0 576 838 A）、特開平7-289253号公報、特開平8-154672号公報、特開平8-336386号公報）。

【0014】上記の反応を触媒する酵素として、様々な微生物由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼが提供されている。フサリウム属（*Fusarium*）、ジベレラ属（*Gibberella*）、ペニシリウム属（*Penicillium*）などに属する菌由来の酵素を用いて、糖化タンパク質の測定を行うことができる。（特開平7-289253号公報、特開平8-154672号公報、特開平8-336386号公報。）フサリウム・オキシスポルムS-1F4（*Fusarium oxysporum* S-1F4；FERM BP-5010）及びジベレラ・フジクロイ（IFO NO.6356及びIFO NO.6605）（*Gibberella fujikuroi*）が産生するフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（以下、それぞれ、FAOD-S及びFAOD-Gと称する）は、フルクトシルリジン、フルクトシルボリリジンに対して強い活性を有することから、アマドリ化合物の内でも特に糖化アルブミンの測定に有用であることが明らかになっている（特開平7-289253号公報）。従って、これらのフルクトシルアミノ酸オキシダーゼによる糖化タンパク質の測定方法が確立されれば、汎用の自動分析装置に適応することもできるため、従来法に比べてもっと安価に短時間で測定を行うことができる。更に酵素の持つ特異性によって正確に生体成分中の糖化タンパクを求めることも可能であるため、健康診断におけるスクリーニング検査や糖尿病患者の治療マーカーとして大いに期待されている測定方法である。

【0015】フルクトシルアミノ酸オキシダーゼによる糖化タンパク質の測定は、糖化タンパク質がフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの活性中心部に効率良く結合されなければならず、糖化タンパク質の分子が大きい場合はプロテアーゼによる前処理が必要となる。フルクトシルアミノ酸オキシダーゼは、糖化タンパク質をプロテア

5

一ゼを用いて小断片化することにより酵素反応速度が上がることは既に周知である。しかしプロテアーゼの種類は非常に数多く、しかもフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの種類によって、酵素反応に理想的な基質の大きさが異なるため、測定反応に用いるプロテアーゼとフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの理想的な組み合わせは限定されてくる。

【0016】プロテアーゼとしてスミチーAMP又はプロテアーゼXIVのうち、少なくとも一方を用いて糖化アルブミンを小断片化した後に、FAOD-S又はFAOD-Gのフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いて糖化アルブミンの濃度を測定する方法が確立されている。(特願平9-107106号)

【0017】上述した菌を培養して分離精製されるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの量は非常に少なく、多量の酵素を得るには時間と労力が必要である。酵素反応によって生成する過酸化水素を測定する場合は、測定しようとする試料毎にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを添加する必要があるため、測定試料の数だけ酵素が必要となり、試料当たりの経費が高くなってしまいうという欠点を有していた。同様に、糖化タンパク質の断片化処理のために、プロテアーゼも添加する必要があり、経費は更に高くなってしまっていた。

【0018】もう1つ重要な問題としては、断片化処理のために添加するプロテアーゼ自身が糖化されており、これが基質となってフルクトシルアミノ酸オキシダーゼと反応し、測定結果に誤差として大きな影響を及ぼしてしまうという問題も生じていた。

【発明が解決しようとする課題】

【0019】糖化タンパク質を含む試料にプロテアーゼを添加して断片化処理を行った後、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを添加して発生する過酸化水素量又は消費する酸素量を求めることにより糖化量又は糖化率を測定すると言う従来法の場合は、断片化処理された糖化タンパク質とフルクトシルアミノ酸オキシダーゼが特異的に反応しなければならない。つまりフルクトシルアミノ酸オキシダーゼと反応するのは試料中に含まれる糖化タンパク質のみでなければならない。試料中に含まれる糖化タンパク質以外に糖化タンパク質が測定系に存在する場合、例えば糖化されたプロテアーゼや糖化されたフルクトシルアミノ酸オキシダーゼが存在すれば、それらの糖化部位にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼが反応してしまうため、測定試料中に含まれる真の糖化量又は糖化率を求めることができず、精度の高い測定ができなくなってしまふ。

【0020】酵素などのタンパク質は、銑型となる遺伝子をスクリーニングして大腸菌などに導入された組み替え体を培養することによって工業的に大量生産している。この組み替え体の培養時に栄養源としてグルコースを添加するため、得られたタンパク質が糖化されてしま

(4)

特開平11-196897

6

う。糖は組み替え体の培養には不可欠であるため、タンパク質と糖が共存する環境下においてはタンパク質の糖化は避けられず、その結果糖化タンパク質の測定に用いられるプロテアーゼやフルクトシルアミノ酸オキシダーゼも糖化されてしまっている。

【0021】糖化されたプロテアーゼがフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの基質となって測定結果に誤差を及ぼす場合に加えて、糖化タンパク質を断片化処理するために添加したプロテアーゼがプロテアーゼ自身を断片化するという自己消化によって糖化されたプロテアーゼが断片化処理されることによる影響も無視できない。フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが認識できる基質の大きさが、小さければ小さい程酵素の基質特異性が高くなる。そのため糖化されたプロテアーゼが自己消化したものは、断片化されない糖化されたプロテアーゼ以上に、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼに反応することになる。

【0022】

【課題を解決するための手段】試料中の糖化タンパク質を測定するために、プロテアーゼ及びフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを固定化担体に固定化し、該固定化担体を充填したプロテアーゼ固定化カラムおよびフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化担体を予め用意し、測定試料をプロテアーゼ固定化カラムにより断片化処理した後、続いてフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化カラムにより過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を検出することによって、糖化率または糖化タンパク質量を求めることができる精度の高い糖化タンパク質の測定方法を確立できた。

【0023】ここで用いるプロテアーゼとは、糖化タンパク質を断片化してフルクトシルアミノ酸オキシダーゼと反応のできるプロテアーゼであって、例えばプロテアーゼXIV、プロナーゼ、プロティナーゼK、ズブチリシン、プロテアーゼS、スミチーAMP、スミチーAMP、カルボキシペプチダーゼY、プロチンFAなどの内から選ばれる酵素担体であっても良いし、複合酵素の混合物を用いることもできる。フルクトシルアミノ酸オキシダーゼは、上述した酵素であれば何れの酵素であっても良い。これらのプロテアーゼ又はフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを固定化する担体としては、例えばアガロース、セルロース、デキストランなどの高分子多糖とその誘導体、多孔質ガラス、シリカゲル、キトサン、ポリアクリルアミドポリスチレン樹脂、セラミック、ナイロン、ポリビニルアルコール、アクリル、アミノ酸共重合体を使用できる。

【0024】酵素を上述した固定化担体に結合する方法としては、物理的吸着方法、イオン結合方法、架橋方法、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法などの共有結合方法など既に一般的に知られている結合方法により、固定化された酵素が高い活性を維持することができ、固

7

定化された担体から離脱することなく固定化されることが可能であれば如何なる方法であっても良い。フルクトシルアミノ酸オキシダーゼによる酵素反応の結果生成される過酸化水素の測定に、ペルオキシダーゼ固定化担体を充填したカラムを用いて測定することもできる。

【0025】フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化カラムによって生成された過酸化水素は、当該技術分野で既知の方法、例えば、発色法、過酸化水素電極を用いる方法によって測定を行う。過酸化水素の比色法における発色系としては、ペルオキシダーゼの存在下で4-アミノアンチピリン(4AA)、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン(MBTH)等のカップラーとフェノール等の色原体との酸化縮合により色素を生成する系を用いることができる。色原体としては、フェノール誘導体、アニリン誘導体、トルイジン誘導体等があり、例えば、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン、N,N-ジメチルアニリン、N,N-ジエチルアニリン、2,4-ジクロロフェノール、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAOS)等が挙げられる。又、ペルオキシダーゼの存在下で酸化されて呈色するロイコ型発色試薬も用いることができ、そのようなロイコ型発色試薬は、当業者に既知であり、o-ジアニジジン、o-トリジン、3,3'-ジアミノベンジジン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン・Na(DA64)、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン・Na(DA67)等が挙げられる。

【0026】色原体を用いる過酸化水素の測定には、比色法のほか、蛍光法、化学発光法も挙げられる。蛍光法には、酸化によって蛍光を発する化合物、例えば、ホモバニリン酸、4-ヒドロキシフェニル酢酸、チラミン、パラクレゾール、ジアセチルフルオレスシン誘導体などを用いることができる。化学発光法には、触媒としてペルオキシダーゼ、フェリシアン化カリウム、ヘミン等を、基質としてルミフェール、ルシゲニン、イソルミノール、ピロガロール等を用いることができる。さらに、過酸化水素の測定には、アルコール(例、メタノール)の存在下でカタラーゼを作用させ、生成するアルデヒドをハンチ反応や、MBTHとの縮合反応により発色させる系も利用できる。このアルデヒドをアルデヒドデヒドロゲナーゼと共役させ、NAD(NADH)の還元を測定\*

プロテアーゼxv(Sigma)  
又は

(5)

特開平11-196897

8

\*することもできる。グルコソンの測定には、ジフェニルアミン等のアルドース試薬を用いることができる。

【0027】過酸化水素を電極を用いて測定する場合、電極には、過酸化水素との間で電子を授受することのできるものであれば何でも使用することができるが、例えば白金、金、銀などが好ましい。測定は、アンペロメトリ、ポテンシオメトリ、クーロメトリ等、当業者既知の方法で行うことができる。また、FAOD又は基質と電極との間の反応に電子伝達体を介在させ、得られる酸化、還元電流あるいはその電気量を測定することもできる。電子伝達体としては、フェロセン誘導体、キノン誘導体等、当業者に既知の物質、又は当業者が通常考え得る電子伝達機能を有する任意の物質であって良い。さらに、FAOD反応により生成する過酸化水素と電極との間に電子伝達体を介在させ、得られる酸化、還元電流あるいはその電気量を測定することもできる。また、プロテアーゼ固定化カラムを用いて糖化タンパク質の小断片化を行った後、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを添加して反応によって消費する酸量又は生成する過酸化水素量を上述した方法により検出する方法で糖化タンパク質の測定を行っても良いし、プロテアーゼ固定化カラムを用いた後フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化カラムを用いて、過酸化水素量の検出を上述した方法により測定する方法であっても良い。

【0028】

【発明の実施の形態】糖化タンパク質をプロテアーゼ固定化カラムによって小断片化処理を行った後、引き続きフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化カラムによって過酸化水素を生成させ、POD固定化カラムによる発色を検出器によって測定を行った。以下に詳細な手順を示す。今回使用したプロテアーゼは、プロテアーゼxv及びビスミチーAMPの2種類と、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼはFAOD-Sを用いて行った。

(実施例1)プロテアーゼ又はフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化カラム固定化担体の作製方法を以下に示す。プロテアーゼ固定化カラムは、プロテアーゼとしてプロテアーゼxv(SIGMA社)及びビスミチーAMP(新日本化学工業)を、プロテアーゼを固定化させる担体はキトナール(BCW-2601)を用いた。プロテアーゼ固定化担体の作製は次の通りに行った。プロテアーゼxv又はビスミチーAMPを0.01M-リン酸緩衝液に溶解し、キトナールを混合して4℃で16時間攪拌を続けた。固定化されなかったプロテアーゼxvをリン酸緩衝液で洗浄除去した後、グルタルアルデヒド溶液を加え、室温で3時間攪拌した。次にゲルの洗浄を0.5M-NaCl添加0.1M-Tris-HClおよび0.1M-Tris-HClを用いて行った。

100mg

- 9  
 スミチームAMP (新日本化学工業) 100mg  
 キトバールBCW-2601 (富士紡績) 1g  
 0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.4)  
 2. 5%グルタルアルデヒド 8ml  
 ゲル洗浄液  
 0.1M Tris-HCl (pH8.0) + 0.5M-NaCl  
 0.1M Tris-HCl (pH8.0)  
 プロテアーゼ固定化担体ゲルは4.6mm I. D. × 30mmサイズのカラムに充填して以下プロテアーゼカラムとして用いた。  
 【0029】フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化担体の作製  
 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化カラムは、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼとしてフサリウムオキシスポラムS1F4の培養物から精製されたFAOD-Sを用い、固定化担体はキトバール (BCW-2601) を用いた。尚フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの\*  
 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ  
 FAOD-S 100mg  
 キトバールAL-01 (富士紡績) 1g  
 0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.4)  
 2. 5%グルタルアルデヒド 8ml  
 ゲル洗浄液  
 0.1M Tris-HCl (pH8.0) + 0.5M-NaCl  
 0.1M Tris-HCl (pH8.0)  
 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化担体ゲルは4.6mm I. D. × 10mmサイズのカラムに充填して以下プロテアーゼカラムとして用いた。  
 【0030】POD固定化担体の作製  
 POD固定化カラムは、POD (オリエンタル酵母社) を用い、固定化担体はキトバール (BCW-2601) を用いた。POD固定化担体の作製は次の通りに行\*  
 POD 100mg  
 キトバールAL-01 (富士紡績) 1g  
 0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.4)  
 2. 5%グルタルアルデヒド 8ml  
 ゲル洗浄液  
 0.1M Tris-HCl (pH8.0) + 0.5M-NaCl  
 0.1M Tris-HCl (pH8.0)  
 POD固定化担体ゲルは4.6mm I. D. × 10mm 40  
 サイズのカラムに充填して以下PODカラムとして用いた。  
 【0031】図1に糖化タンパク質の測定装置を簡単に示す。プロテアーゼ固定化カラム、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化カラム、POD固定化カラムを図に示した様にセットして測定装置とした。測定時に各カラムを通る溶液は、A溶液として次に示すものを混合したものを使用した。  
 1M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5)  
 2M DTT (和光純薬社製)  
 3mM 4-アミノアンチピリン (和光純薬社製)  
 3mM TOOS (SIGMA社製)  
 A溶液容器から移送管を通してポンプ (LC-6A 島津社製) に流入されてインジェクションバルブを通りプロテアーゼ固定化カラム、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化カラムおよびPOD固定化カラムを通る。測定試料はインジェクションバルブから20μl注入されてプロテアーゼ固定化カラムで小断片化された後、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化カラムで糖化タンパク質が分解されて過酸化水素の発生が起こる。続いてPOD固定化カラムでの発色は吸光度計 (SPD-6  
 特開平11-196897  
 10  
 \* 作製方法は、特開平7-289253に記載の通り行った。フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化担体の作製は次の通りに行った。フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを0.01M-リン酸緩衝液に溶解し、キトバールを混合して4℃で16時間攪拌を続けた。固定化されなかったフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをリン酸緩衝液で洗浄除去した後、グルタルアルデヒド溶液を加え、室温で3時間攪拌した。次にゲルの洗浄を0.5M-NaCl添加0.1M-Tris-HClおよび0.1M-Tris-HClを用いて行った。  
 ※ った。PODを0.01M-リン酸緩衝液に溶解し、キトバールを混合して4℃で16時間攪拌を続けた。固定化されなかったPODをリン酸緩衝液で洗浄除去した後、グルタルアルデヒド溶液を加え、室温で3時間攪拌した。次にゲルの洗浄を0.5M-NaCl添加0.1M-Tris-HClおよび0.1M-Tris-HClを用いて行った。

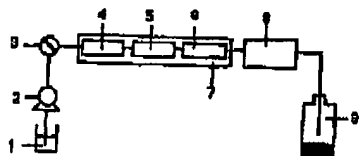
11

AV 島津社製)を用いて555nmにおける吸光度を測定した。今回アマドリ化合物のモデル物質として、社内調製した糖化ポリリジンの測定を行った。調整方法はポリリジン(シグマ社製)100mgとD-グルコース(ナカライ社製)500mgを蒸留水10mlに溶解して50℃で1週間インキュベーションした後、糖化に関与しないD-グルコースはゲル濾過によって取り除いた。次にフルクトサミン「BMY」(ペーリンガー・マンハイム)キットを用いて濃度を測定したところ400  $\mu\text{mol/l}$ であることが確認された。この糖化ポリリジンを用いて、各濃度に調整された糖化ポリリジン溶液について測定を行った結果を図2に示す。555nmにおける吸光度は糖化ポリリジンの濃度に依存しており、直線性が示された。

【0032】

【発明の効果】本発明によって試料中の糖化タンパク質濃度を効率よく測定することができ、精度の高い測定結\*

【図1】



(7)

特開平11-196897

12

\*果を得ることができる。

【0033】

【図面の簡単な説明】

【図1】 固定化カラムを用いた測定装置を示す。

【図2】 測定装置を用いて行った糖化ポリリジンの測定結果を示す。

【0034】

【符号の説明】

溶液容器

10 ポンプ

インジェクションバルブ

プロテアーゼ固定化カラム

フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ固定化カラム

POD固定化カラム

オープン

検出器

廃液ボトル

【図2】

